

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 785 292

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

98 13695

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : C 12 N 11/14, C 12 N 11/04, B 01 J 13/06 // (C 12 N  
11/14, C 12 R 1:19)

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 30.10.98.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 05.05.00 Bulletin 00/18.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RHODIA CHIMIE — FR.

⑦② Inventeur(s) : DUPUIS DOMINIQUE et JOURDAT  
CATHERINE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ CAPSULES A ECORCE MINERALE POREUSE DANS LESQUELLES SONT IMMOBILISEES DANS UN MILIEU  
BIOLOGIQUE LIQUIDE, UNE OU PLUSIEURS MATIERES BIOLOGIQUES, LEURS PROCEDE DE  
PREPARATION ET UTILISATIONS.

⑤⑦ L'invention a pour objet une capsule minérale consti-  
tuée d'une écorce minérale et d'un noyau liquide dans le-  
quel est immobilisée, au moins une matière active  
biologique.

Elle se rapporte en outre à un procédé de préparation  
desdites capsules ainsi qu'à leurs utilisations.

FR 2 785 292 - A1



La présente invention a pour objet de nouvelles capsules à écorce minérale poreuse au sein desquelles sont immobilisées, dans un milieu liquide, une ou plusieurs matières actives biologiques.

5 D'une manière générale, les techniques d'immobilisation de matières actives visent à limiter et plus préférentiellement à faire obstacle à leur migration libre dans un milieu environnant.

Il existe deux méthodes générales d'immobilisation :

10 La première méthode consiste à lier la matière active à immobiliser à une surface de type support soit par adsorption (interactions de type ionique, liaisons Van der Waals), soit par liaison covalente ou via un composé intermédiaire.

15 La seconde méthode vise en revanche à retenir physiquement la matière active à l'intérieur d'une matrice solide ou poreuse telle qu'un gel stabilisé.

Cette seconde approche est largement utilisée pour l'immobilisation de matières actives biologiques de type cellules ou enzymes par exemple. On procède le plus couramment à une encapsulation physique des matières actives biologiques considérées à l'intérieur d'une matrice polymérique.

20 Le matériau d'encapsulation doit en fait répondre à plusieurs exigences :

— Il doit contribuer à assurer la stabilité de la structure et l'activité de la matière active immobilisée ;

25 — Il doit posséder une porosité suffisante pour contrôler la diffusion de la matière active immobilisée et le cas échéant ses échanges avec le milieu environnant et

— Il doit permettre le cas échéant une réutilisation aisée de la matière active immobilisée.

30 Les matériaux les plus fréquemment mis en œuvre pour procéder à ce type d'immobilisation sont les gels hydrocolloïdes. A titre illustratif de ces gels, on peut notamment citer les gels naturels tels que les alginates et les

carraghénanes. Toutefois d'autres réseaux polymériques de nature synthétique ont également été développés comme celui à base de polyacrylamide.

Ce type d'encapsulation est généralement obtenu par addition de la matière active à immobiliser sous la forme d'une suspension dans une solution aqueuse d'un précurseur du matériau d'encapsulation. La solution de précurseur y est ensuite transformée en gouttelettes généralement par dispersion. Enfin, ces gouttelettes sont stabilisées sous forme de billes dans lesquelles la matière active est piégée, soit par polymérisation ou tout autre type de réticulation.

Il a également été proposé d'encapsuler des enzymes dans une structure poreuse de nature minérale. La technique d'encapsulation retenue est alors apparentée à la technique sol-gel. Selon ce mode d'encapsulation, on initie l'hydrolyse et la polycondensation d'un alcoxyde métallique dans l'eau ou en milieu hydroalcoolique, on y disperse l'enzyme et la composition résultante est ensuite gélifiée puis séchée.

Comparativement à des matrices organiques à base d'un gel naturel de type alginate ou carraghénane, ces matrices inorganiques sont particulièrement avantageuses. Leur résistance mécanique est considérablement accrue. Elles présentent généralement un caractère hydrophile ainsi qu'une meilleure stabilité aux solvants et aux pH. Qui plus est, elles sont stables en milieu salin concentré contrairement aux matrices organiques à base d'alginate par exemple.

Toutefois, tout comme les systèmes d'encapsulation matriciels organiques, ces matrices inorganiques sont inadaptées au conditionnement de matières actives biologiques nécessitant d'être conservées dans un milieu liquide. Par ailleurs, la faible porosité de ces systèmes, en raison de leur caractère matriciel, constitue un obstacle à la croissance de matières actives biologiques et au maintien de leur activité.

La présente invention a précisément pour objet de proposer un nouveau mode d'encapsulation, particulièrement avantageux dans la mesure où il permet justement de conserver des matières actives biologiques dans un environnement liquide propice à la conservation de leur structure et activité et le

cas échéant leur développement interne tout en les protégeant efficacement contre toute dégradation susceptible de leur être occasionnée par le milieu environnant.

5                   La présente invention a donc pour premier objet une capsule minérale constituée d'une écorce minérale et d'un noyau liquide dans lequel est immobilisée au moins une matière active biologique.

10                   Au sens de la présente invention on entend couvrir sous la dénomination matière active biologique toute molécule, cellule ou organisme possédant un intérêt industriel en raison de son activité biologique.

                  A titre illustratif de ces matières actives biologiques, on peut notamment citer les organismes cellulaires comme les microorganismes de type bactéries, levures, champignons et algues, les cellules d'origine animale  
15                   ou végétale, les enzymes ou protéines de type anticorps par exemple.

                  Il s'agit plus préférentiellement de cellules ou organismes vivants.

                  Comme exemples de molécules biologiquement actives, on peut plus particulièrement mentionner les enzymes telles les hydrolases, nucléases, oxydases, protéases, isomérases et analogues.

20                   Il peut en particulier s'agir d'oxydoréductases telles les alcools deshydrogénases, les oxygénases et les glucose deshydrogénases, de transférases comme la D-glutamyl transférase, de lyases comme les fumarase et aspartase, d'hydrolases comme les lipases, nitrilehydratases, lactases et acylases ainsi que d'isomérases. Il peut également s'agir de protéines ou de  
25                   complexes protéiques de type cytochrome C, hémoglobine, myoglobine, transferrine ou superoxyde dismutase ou d'anticorps.

                  Comme exemple de bactéries, on peut plus particulièrement citer les bactéries lactiques et les bactéries de l'environnement.

30                   Par opposition aux systèmes d'encapsulation classiques évoqués ci-dessus, la matière active biologique est dans le cas de la présente invention non pas adsorbée sous une forme dispersée au sein d'une matrice mais

concentrée dans un milieu liquide qui est isolé du milieu environnant par une écorce minérale.

Au sens de la présente invention, on entend par milieu liquide, un milieu apte à assurer la conservation de l'activité et la structure et/ou la survie et  
5 le cas échéant le développement interne d'une matière active biologique, ce milieu étant sous une forme fluide de type liquide. A ce titre, il diffère des milieux de type alginate ou carraghénane qui s'apparentent eux à des milieux sous forme gel.

Il peut notamment s'agir du milieu biologique naturel de la matière  
10 active biologique immobilisée. Généralement ce milieu biologique liquide est ou dérive d'un milieu aqueux.

Bien entendu, ce milieu liquide peut être tamponné et/ou  
supplémenté en oligo-éléments, sucres, sels et tout autre agent nutritif susceptible d'être nécessaire à la conservation de l'activité et la structure et/ou  
15 la survie et le cas échéant au développement interne de la matière active biologique immobilisée.

Ces matières actives, selon leur caractère hydrosoluble, sont soit solubilisées ou dispersées dans le milieu liquide.

L'écorce minérale obtenue selon le procédé de l'invention a pour  
20 double avantage de protéger efficacement le milieu liquide et la ou les matière(s) active(s) qu'il contient, et le cas échéant de permettre ses échanges avec le milieu environnant des capsules. Ceci est notamment réalisé en ajustant le degré de porosité des capsules minérales obtenues selon l'invention.

Selon une première variante de l'invention, les capsules minérales  
25 obtenues peuvent être non poreuses. Cette spécificité est plus particulièrement avantageuse lorsque l'on souhaite essentiellement assurer une protection efficace du milieu liquide, incorporant au moins une matière active biologique, vis à vis de son milieu environnant. Par opposition aux microcapsules obtenues par polycondensation interfaciale et qui sont constituées d'une écorce  
30 organique, les capsules obtenues selon l'invention sont beaucoup plus résistantes mécaniquement, thermiquement et chimiquement en raison du caractère minéral de leur écorce. Dans ce cas particulier, le milieu aqueux et le

cas échéant la matière active qu'il contient sont libérés généralement par fractionnement de la capsule ou encore par dégradation induite de celle-ci.

Selon une seconde variante de l'invention, les capsules obtenues peuvent être poreuses et cette porosité est contrôlable. Ceci présente un  
5 intérêt significatif lorsque l'on souhaite, outre protéger le milieu liquide et la matière active qu'il contient, permettre ses échanges avec le milieu environnant desdites capsules.

En fait, cet ajustement de la porosité de même que celui de la taille des capsules sont accomplis à travers principalement le choix du matériau  
10 minéral constituant l'écorce minérale ou plus précisément le choix du précurseur de ce matériau. Cet aspect de l'invention est discuté de manière plus détaillée ci-après.

La présente invention est donc particulièrement avantageuse dans  
15 la mesure où elle propose un mode de conditionnement fiable, compatible avec le développement interne des matières actives immobilisées et modulable en fonction de la nature et la quantité de matière(s) active(s) immobilisée(s).

La préservation au sein de la capsule d'un milieu liquide qui peut être le milieu biologique naturel de la matière active immobilisée est une  
20 garantie d'un fonctionnement prolongé de ladite matière active, fonctionnement qui peut par exemple se traduire par une production de métabolites ou être enzymatique.

La nature minérale de l'écorce des capsules revendiquées constitue une barrière de protection efficace à la matière active biologique vis-à-  
25 vis du milieu environnant tout en autorisant le cas échéant ses échanges avec celui-ci.

La taille des capsules étant maîtrisable, elle peut être ajustée en fonction des contraintes liées à la dimension des matières actives à encapsuler ou encore au nombre de ces matières actives biologiques.

30 Enfin, cette capsule est préparée dans le cadre de la présente invention dans des conditions opératoires suffisamment douces pour ne pas affecter l'intégrité desdites matières actives. La matière active à immobiliser

n'est en effet pas exposée lors de son conditionnement à des valeurs de température et le cas échéant de pH susceptibles de lui porter préjudice.

En ce qui concerne la composition de l'écorce minérale, elle est  
5 constituée d'au moins un oxyde et/ou hydroxyde d'aluminium, de silicium, de zirconium et/ou d'un métal de transition.

Par métal de transition on entend plus particulièrement les métaux de la quatrième période allant du scandium au zinc dans la mesure où ceux-ci sont bien entendu compatibles en terme d'innocuité avec l'application visée. Il  
10 s'agit plus particulièrement d'un oxyde ou hydroxyde de titane, manganèse, fer, cobalt, nickel ou de cuivre.

Bien entendu, cette écorce minérale peut comprendre des oxydes et/ou hydroxydes de natures différentes.

Conviennent plus particulièrement à la présente invention les  
15 oxydes et/ou hydroxydes de silicium, aluminium, titane et de zirconium.

Selon un mode préférentiel de l'invention, les capsules comprennent une écorce minérale à base d'au moins un oxyde de silicium.

De manière générale, la taille des capsules selon l'invention peut  
20 être comprise entre 1 et plusieurs dizaines de micromètres. La taille des particules du matériau minéral constituant l'écorce de ces capsules peut varier pour sa part entre 1 et 200 nm.

En ce qui concerne plus particulièrement l'épaisseur de l'écorce minérale, elle peut varier entre 1 et 200 nm.

25 On peut également caractériser ces capsules par la quantité de milieu liquide que l'écorce minérale retient en introduisant le paramètre rétention de la capsule. Celui-ci correspond au rapport de la masse du milieu liquide contenue dans la capsule et celle de l'écorce minérale.

Lorsque l'écorce est trop poreuse, la rétention de la capsule est  
30 faible. On peut donc faire varier la rétention des capsules en fixant la taille des particules du matériau constituant l'écorce minérale ainsi que l'épaisseur de cette dernière.

La présente invention a également pour objet un procédé utile pour préparer des capsules minérales conformes à la présente invention ledit procédé comprenant

1) la mise en émulsion d'un milieu liquide contenant au moins une  
5 matière active biologique au sein d'une seconde phase non miscible avec ledit milieu liquide de manière à l'y disperser sous forme de gouttelettes,

2) la mise au contact, au sein de l'émulsion inverse ainsi obtenue, d'au moins un composé hydrolysable et polycondensable de zirconium, silicium, aluminium et/ou un métal de transition dans des conditions de température et  
10 de pH propices à la formation d'un précipité constitué de l'oxyde ou l'hydroxyde correspondant et

3) la récupération des capsules minérales ainsi formées et le cas échéant leur purification,  
ledit procédé étant caractérisé en ce que la formation du précipité minéral dans  
15 la seconde étape est conduite en présence d'un système tensioactif amphiphile, présent au niveau de l'émulsion et capable de concentrer le dépôt des particules minérales dudit précipité formé à l'interface des gouttelettes et de la seconde phase et de bloquer efficacement leur diffusion au sein desdites gouttelettes.

20 Le système tensioactif amphiphile proposé selon l'invention a pour avantage de bloquer le phénomène de diffusion naturel des particules minérales vers le centre des gouttelettes.

Au sens de l'invention, on entend désigner par système tensioactif amphiphile soit un composé unique au niveau duquel coexistent deux régions  
25 dotées de solubilités très différentes et suffisamment éloignées l'une de l'autre pour se comporter de manière indépendante, soit une association d'au moins deux composés possédant des solubilités très différentes tels un premier composé à caractère hydrophile et un second composé à caractère hydrophobe. Généralement ces deux régions ou composés comprennent  
30 respectivement au moins un groupement hydrophile et une ou plusieurs longues chaînes à caractère hydrophobe.

En conséquence, le système tensioactif mis en œuvre selon l'invention peut être représenté par un composé unique et qui sera alors



introduit préalablement à la réalisation de la seconde étape c'est-à-dire l'étape d'hydrolyse et de polycondensation ou encore résulté d'une interaction in situ d'au moins deux composés comme par exemple un tensioactif organosoluble initialement présent dans la seconde phase généralement organosoluble et un  
5 composé hydrosoluble présent dans le milieu liquide généralement aqueux. On peut également envisager un couplage ou une complexation entre un premier agent organosoluble et un second agent organosoluble à caractère ionique comme un ammonium quaternaire. Les deux composés se rencontrent à l'interface des gouttelettes formées lors de la mise en émulsion. De part leur  
10 interaction, ils contribuent d'une part à stabiliser le système en diminuant la tension interfaciale à l'interface des gouttelettes et agissent vraisemblablement comme une barrière stérique ou électrostatique.

Dans le procédé revendiqué, est plus particulièrement préféré le  
15 mode de réalisation mettant en œuvre au moins deux composés distincts capables d'interagir pour conduire à un système tensioactif apte à s'opposer efficacement à la diffusion des particules minérales dans les gouttelettes aqueuses et à stabiliser ladite émulsion.

Le système tensioactif proposé selon l'invention comprend de  
20 préférence au moins un tensioactif doté d'une valeur HLB inférieure à 7.

Le terme HLB désigne le rapport de l'hydrophilie des groupements polaires de la molécule de tensioactif sur l'hydrophobie de la partie lipophile de cette même molécule.

Dans ce cas particulier, les deux composés sont de préférence  
25 respectivement présents dans le milieu liquide, généralement aqueux et la seconde phase généralement organosoluble et interagissent l'un vis à vis de l'autre lors de la mise en émulsion du milieu liquide dans ladite seconde phase.

Cette option a pour avantage de conférer à l'émulsion correspondante une stabilité satisfaisante dès sa formation. Qui plus est, il  
30 s'avère possible, si nécessaire, en sélectionnant de manière appropriée les agents constituant le système tensioactif amphiphile, d'ajuster le pH à une valeur compatible avec la matière active.

En ce qui concerne la mise en émulsion, elle peut être réalisée en appliquant une énergie mécanique d'agitation intense aux deux phases initiales, et/ou une sonication. La taille des gouttelettes obtenues à l'issue de l'étape de mise en émulsion peut être comprise entre environ 0,1 et une dizaine de  $\mu\text{m}$ .

5

Le composé présent au niveau du milieu liquide, généralement aqueux possède de préférence une action viscosifiante.

Plus particulièrement, ce composé peut être un composé choisi parmi les sucres et leurs dérivés. Conviennent à ce titre les oses (ou monosaccharides), les osides et les polyholosides fortement dépolymérisés. On entend des composés dont la masse molaire en poids est plus particulièrement inférieure à 20 000 g/mole.

Parmi les oses on peut mentionner les aldoses tels que le glucose, mannose, galactose et les cétooses tels que le fructose.

15 Les osides sont des composés qui résultent de la condensation, avec élimination d'eau, de molécules d'oses avec des molécules non glucidiques. Parmi les osides, on préfère les holosides qui sont formés par la réunion de motifs exclusivement glucidiques et plus particulièrement les oligoholosides (ou oligosaccharides) qui ne comportent qu'un nombre restreint de ces motifs, c'est-à-dire un nombre en général inférieur ou égal à 10. A titre d'exemples d'oligoholosides on peut mentionner le saccharose, le lactose, la cellobiose, le maltose.

25 Les polyholosides (ou polysaccharides) fortement dépolymérisés convenables sont décrits par exemple dans l'ouvrage de P. ARNAUD intitulé "Cours de chimie organique", GUTHIER-VILLARS éditeurs, 1987. Plus particulièrement, on met en œuvre des polyholosides dont la masse moléculaire en poids est plus particulièrement inférieure à 20 000 g/mole.

A titre d'exemple non limitatif de polyholosides fortement dépolymérisés, on peut citer le dextran, l'amidon, la gomme xanthane et les galactomannanes tels que le guar ou la caroube. Ces polysaccharides présentent de préférence un poids de fusion supérieur à 100°C et une solubilité dans l'eau comprise entre 10 et 500 g/l.

Conviennent également à l'invention la gomme arabique, la gélatine et leurs dérivés gras comme les sucroesters d'acides gras, les carbohydrates alcools de type sorbitol, mannitol, les carbohydrates éthers comme les méthyl-, éthyl-, carboxyméthyl-, hydroxyéthyl- et hydroxypropyl-  
5 éthers de cellulose et les glycérols, pentaérythrol, propylèneglycol, éthylène glycol, les diols non visqueux et/ou alcools polyvinyliques.

Il s'agit de préférence d'un hydrocolloïde. A titre représentatif de ce type de composés on peut notamment citer les alginates, les polysaccharides de type gomme naturelle comme les carraghénanes, la  
10 xanthane et le guar et tout particulièrement les dérivés de cellulose.

De manière préférée, il s'agit d'un dérivé de cellulose et plus préférentiellement de l'hydroxyéthylcellulose.

Le ou les tensioactif(s) généralement organosoluble(s) présent(s)  
15 au niveau de la seconde phase peuvent être choisi(s) parmi les alcools gras, les triglycérides, les acides gras, les esters de sorbitan, les amines grasses, ces composés étant ou non sous une forme polyalcoxylée, les lécithines liposolubles, les polyalkylènes dipolyhydroxystéarates, les sels d'ammonium quaternaires, les monoglycérides, les esters de polyglycérol, le polyricinoléate  
20 de polyglycérol et les esters lactiques.

Les alcools gras comprennent généralement de 6 à 22 atomes de carbone. Les triglycérides peuvent être des triglycérides d'origine végétale ou animale (tels que le saindoux, le suif, l'huile d'arachide, l'huile de beurre, l'huile de graine de coton, l'huile de lin, l'huile d'olive, l'huile de poisson, l'huile de  
25 coprah, l'huile de noix de coco).

Les acides gras sont des esters d'acide gras (tels que par exemple l'acide oléique, l'acide stéarique).

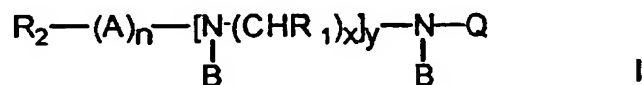
Les esters de sorbitan sont des esters du sorbitol cyclisés d'acide gras comprenant de 10 à 20 atomes de carbone comme l'acide laurique, l'acide  
30 stéarique ou l'acide oléique.

Selon un mode préféré de l'invention, ce tensioactif est un ester de sorbitan tel que défini ci-dessus et plus préférentiellement le sesquioléate de sorbitan.

Comme il ressort de l'exposé précédent, le composé présent dans le milieu liquide généralement aqueux doit interagir avec le tensioactif présent dans la seconde phase généralement hydrophobe pour conduire à un système tensioactif capable de constituer une barrière de diffusion efficace à l'égard des particules du précipité minéral. En conséquence, leurs choix respectifs doivent être effectués en tenant compte de cet impératif.

Bien entendu la nature de la matière active à encapsuler de même que la composition de l'écorce minérale des capsules préparées selon l'invention sont également des éléments déterminants dans le choix du système tensioactif et l'appréciation des quantités respectives des deux composés correspondants. Ces ajustements relèvent en fait des compétences de l'homme de l'art.

Dans le cas particulier où est privilégiée selon l'invention la mise en œuvre d'un unique composé de type amphiphile conviennent tout particulièrement ceux répondant à la formule générale I :



dans laquelle :

$R_2$  représente un radical alkyle ou alcényle comprenant 7 à 22 atomes de carbone,  $R_1$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle comprenant 1 à 6 atomes de carbone, A représente un groupement (CO) ou (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), n vaut 0 ou 1, x vaut 2 ou 3, y vaut 0 à 4, Q représente un radical -R<sub>3</sub>-COOM avec  $R_2$  représentant un radical alkyle comprenant 1 à 6 atomes de carbone, M représente un atome d'hydrogène, un métal alcalin, un métal alcalino-terreux ou encore un groupement ammonium quaternaire dans lequel les radicaux liés à l'atome d'azote, identiques ou différents, sont choisis parmi l'hydrogène ou un radical alkyle ou hydroalkyle possédant 1 à 6 atomes de carbone, et B représente H ou Q.

De préférence, M représente un atome d'hydrogène, le sodium, le potassium et un groupement NH<sub>4</sub>.

Parmi ces tensioactifs correspondants à la formule I, on met plus particulièrement en œuvre les dérivés amphotères des alkyl polyamines comme l'amphionic XL<sup>®</sup>, le Mirataine H2C-HA<sup>®</sup> commercialisés par Rhodia Chimie ainsi que l'Ampholac 7T/X<sup>®</sup> commercialisés par Berol Nobel.

5 On peut également mettre en œuvre un tensioactif principal non-ionique dont la partie hydrophile contient un ou plusieurs motif(s) saccharide(s). Lesdits motifs saccharides contiennent généralement de 5 à 6 atomes de carbone. Ceux-ci peuvent dériver de sucres comme le fructose, le glucose, le mannose, le galactose, le talose, le gulose, l'allose, l'altose, l'idose, l'arabinose,  
10 le xylose, le lyxose et/ou le ribose.

Parmi ces agents tensioactifs à structure saccharide, on peut mentionner les alkylpolyglycosides. Ceux-ci peuvent être obtenus par condensation (par exemple par catalyse acide) du glucose avec des alcools gras primaires (US-A-3 598 865 ; US-A-4 565 647 ; EP-A-132 043 ; EP-A-132  
15 046 ; Tenside Surf. Det. 28, 419, 1991, 3 ; Langmuir 1993, 9, 3375-3384) présentant un groupe alkyle en C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>, de préférence de l'ordre de 1,1 à 1,8 par mole d'alkylpolyglycoside (APG) ; on peut mentionner notamment ceux commercialisés respectivement sous les dénominations GLUCOPON 600 EC<sup>®</sup>, GLUCOPON 650 EC<sup>®</sup>, GLUCOPON 225 CSUP<sup>®</sup>, par HENKEL.

20 A titre illustratif, la concentration en système tensioactif amphiphile peut être comprise entre environ 1% et 10% en poids par rapport à la phase organosoluble.

Selon un mode préférentiel de l'invention, le tensioactif incorporé au niveau de la seconde phase généralement organosoluble, est un ester de  
25 sorbitan et plus préférentiellement le sesquioléate de sorbitan. Quant au composé incorporé dans le milieu liquide, il s'agit préférentiellement d'un dérivé de cellulose et plus particulièrement de l'hydroxyéthyle de cellulose.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la matière de l'écorce minérale dérive de l'hydrolyse et la polycondensation d'un ou plusieurs  
30 alcoxydes de formule II.



dans laquelle :

- M représente un élément choisi parmi le titane, manganèse, fer, cobalt, nickel, silicium, aluminium ou zirconium,
- R est un substituant hydrolysable,
- n est un entier compris entre 1 et 6,
- 5 – P est un substituant non hydrolysable et
- m est un entier compris entre 0 et 6.

Selon un mode préféré de l'invention :

- M est choisi parmi la silice, l'aluminium, le titane et le zirconium,
- R est un groupement choisi parmi les groupements alkoxy et/ou aryloxy en  
10 C<sub>1</sub> à C<sub>18</sub> et de préférence en C<sub>2</sub> à C<sub>8</sub> et n est un entier compris entre 2 et 4  
et
- P est un groupement choisi parmi les groupements alkyles en C<sub>1</sub> à C<sub>8</sub>,  
aryles ou alcényle en C<sub>2</sub> à C<sub>8</sub>.

En ce qui concerne R, il s'agit de préférence d'un groupement  
15 alkoxy en C<sub>1</sub> à C<sub>6</sub> et plus préférentiellement en C<sub>2</sub> à C<sub>4</sub>. Ce groupement alkoxy  
peut le cas échéant être substitué par un groupement alkyle ou alkoxy en C<sub>1</sub> à  
C<sub>4</sub> ou un atome d'halogène. Dans la formule générale II, R peut représenter des  
groupements alkoxy identiques ou différents.

Bien entendu, on peut mettre en œuvre plusieurs composés de  
20 formule II.

Comme discuté précédemment, il s'avère possible à travers le  
choix de ce composé hydrolysable et polycondensable minéral d'ajuster la  
porosité et la taille des capsules.

25 De même, on peut conférer un caractère plus ou moins  
hydrophobe à la capsule en jouant sur la nature et par exemple la longueur des  
chaînes alkyles et/ou alcoxy constituant ce composé hydrolysable et  
polycondensable minéral.

30 Généralement, l'hydrolyse et la polycondensation de ce  
précurseur minéral s'accomplissent soit spontanément par mise en présence de  
celui-ci avec l'émulsion soit sont initiées par ajustement du pH et/ou de la

température de l'émulsion à une valeur propice à leur manifestation. Cet ajustement peut notamment relever de la présence dans l'émulsion d'ions hydrosolubles comme  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaOH}$  ou  $\text{HCl}$  ou organosolubles de type amines. Ces ajustements relèvent de la compétence de l'homme du métier.

5            Selon une variante préférée de la présente invention, l'écorce minérale obtenue selon l'invention est à base d'oxyde de silicium. Elle dérive de la précipitation d'au moins un silicate.

          Comme silicate convenant à la présente invention, on peut plus particulièrement citer le tétraméthylorthosilicate, TMOS, le  
10    tétraéthylorthosilicate, TEOS, le tétrapropylorthosilicate, TPOS, les alkylalcoxysilanes et les halogénoalkylsilanes.

          Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la capsule minérale est obtenue par formation d'un précipité minéral en présence d'un  
15    agent d'hydrolyse et de condensation dudit composé.

          L'hydrolyse de ces alcoxydes de silicium peut se faire aussi bien en catalyse acide qu'en catalyse basique sous réserve que les oxydes et/ou hydroxydes correspondants soient obtenus sous une forme pulvérulente.

          De préférence on met en œuvre un alcoxyde de silicium comme le  
20    tétraéthylorthosilicate, TEOS, en présence d'ammoniaque, à titre d'agent d'hydrolyse et polycondensation.

          La seconde phase est généralement une phase huileuse non miscible avec le milieu liquide généralement aqueux et est de préférence  
25    composée d'une huile choisie parmi les huiles végétales, animales et minérales. Il peut par exemple s'agir d'une huile paraffinique ou d'une huile de silicone.

          Toutefois, on peut également envisager de mettre en œuvre d'autres solvants organiques comme les solvants perfluorés sous réserve que  
30    ces solvants soient utilisés dans des conditions appropriées, par exemple sous forme d'un mélange pour conduire à une émulsion avec le milieu liquide.

A titre de seconde phase convenant tout particulièrement à l'invention, on peut notamment citer le solvant Isopar® qui est une isoparaffine commercialisée par la société Exxon Chemicals.

5 Cette seconde phase comprend au moins un tensioactif généralement organosoluble qui est de préférence choisi parmi les esters de sorbitan et plus préférentiellement est représenté par le sesquioléate de sorbitan.

10 En ce qui concerne le milieu liquide généralement aqueux, il comprend au moins un hydrocolloïde, éventuellement l'agent d'hydrolyse et de polycondensation du précurseur hydrolysable et polycondensable minéral.

En ce qui concerne l'hydrocolloïde, il s'agit de préférence d'un dérivé de cellulose et plus préférentiellement de l'hydroxyéthylcellulose.

15 Les capsules minérales selon l'invention sont particulièrement intéressantes pour des utilisations dans les domaines de fermentation biomédicaux, alimentaires et en industrie chimique.

On peut ainsi envisager d'immobiliser, au sein des capsules revendiquées, des cellules possédant une activité intéressante pour la  
20 production de produits pharmaceutiques, de métabolites et/ou de réactifs comme des intermédiaires de synthèse chimiques ou pharmaceutiques ou encore des polymères biodégradables.

L'immobilisation selon l'invention de microorganismes de type levures ou bactéries est également particulièrement intéressante pour l'industrie  
25 alimentaire et tout particulièrement pour les industries laitière et viticole.

Des enzymes immobilisées selon l'invention peuvent représenter pour leur part des réactifs de choix dans de nombreux procédés de fabrication industriels pour des méthodes catalytiques ou analytiques.

De même on peut envisager de mettre en œuvre des capsules  
30 selon l'invention à base de cellules vivantes ou d'enzymes dans le traitement des eaux usées ou des déchets.



Les exemples et la figure qui suivent sont présentés à titre

### Figures :

- 5                    –        Figure 1 : Photographie par microscopie en balayage  
                                 (MEB) de capsules selon l'invention incorporant E. coli.

- |    |  |   |
|----|--|---|
| 10 | <b><u>Matières premières :</u></b>                 |   |
|    | Isopar M® (EXXON)                                  | Densité à 15°C : 0,786                  |
|    | Arlacel 83® (ICI)                                  | Sesquioléate de sorbitan                |
|    | HEC (SIGMA ALDRICH)                                | Hydroxyéthylcellulose                   |
| 15 | Solution aqueuse d'ammoniaque (NH <sub>4</sub> OH) | Densité à 20°C : 0,880                  |
|    |  | Concentration en NH <sub>3</sub> : 20 % |

Silicate de méthyle :  $\text{Si}(\text{OMe})_4$       Masse molaire : 156 g  
Densité à 20°C : 1.032

20 Tampon phosphate de sodium à pH 7.

**Escherichia Coli K12 exprimant une  $\beta$ -galactosidase.**

### Exemple 1 : Encapsulation de E. Coli

- 25
- Composition globale du milieu réactionnel :

30	Phase aqueuse :	H <sub>2</sub> O	43,40 g	
		HEC	2,61 g	(6 %/eau)
		NH <sub>3</sub>	5,00 g	(1 mol/l)
		E. Coli	4 g	(soit 1 g de cellules sèches)

Phase organique : Arlacel 83<sup>®</sup> 17,35 g  
Isopar M<sup>®</sup> 850 g

tétraméthylorthosilane<sup>®</sup> TMOS 28,5 g

5

Préparation de la phase aqueuse :

On homogénéise le HEC dans l'eau épurée au bain marie à 40°C pendant 20 minutes environ. On obtient ainsi un mélange visqueux jaune  
10 limpide. On y ajoute alors les cellules puis la solution aqueuse ammoniacale.

Préparation de la phase organique :

On solubilise l'Arcacel 83<sup>®</sup> dans l'Isopar M<sup>®</sup>.

15

Préparation de l'émulsion :

La phase organique et la phase aqueuse sont émulsifiées à l'aide d'un Ultraturrax<sup>®</sup>, on obtient ainsi une émulsion eau/huile présentant une  
20 stabilité de plusieurs heures. La taille des gouttelettes est voisine de la dizaine de microns.

Synthèse des capsules :

25 Dans un tricol de 2 litres muni d'un barreau aimanté, on introduit l'émulsion préparée précédemment.

On y ajoute le tétraméthylorthosilane TMOS(28,5 g) avec un débit de 0,5 ml/min. (durée de l'introduction de TMOS = 1 heure) à 25°C.

30 Les particules obtenues sont séparées et lavées au méthanol puis 2 fois au tampon phosphate par centrifugation puis séchées à température ambiante pendant une nuit.

### Caractérisations :

La taille des particules de silice qui constitue l'écorce est voisine de quelques nanomètres.

5 Les capsules présentent une taille de l'ordre d'une dizaine de  $\mu\text{m}$  (MEB). L'encapsulation des bactéries est parfaitement visualisée par MET (microscopie électronique de transmission), ainsi que la porosité de la capsule.

Les photographies présentées en figures 1 et 2 rendent compte de  
10 l'aspect de ces capsules.

### Exemple 2 : détermination de l'activité enzymatique des biocapsules

15 L'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase de *E. Coli* est déterminée après hydrolyse enzymatique du para-nitrophényle- $\beta$ -D-galactoside (p-NPG) en p-nitrophénol. La mesure quantitative du p-nitrophénol par spectrophotométrie permet d'en déduire l'activité enzymatique des biocapsules.

20 L'activité enzymatique des biocapsules de l'exemple 1 est exprimée en  $\mu\text{mole/h/mg}$  de CS (cellules sèches), ceci comparativement à la bioactivité des cellules de départ. L'activité enzymatique des cellules de départ est de  $0,2 \mu\text{mole/h/mg}$  de CS, le rendement d'activité des biocapsules est d'environ 50 %. L'activité des cellules est donc bien préservée.

**Exemple 3 : Obtention de capsules de silice, avec une taille des particules constituant l'écorce de quelques nanomètres.**

30 Composition globale du milieu réactionnel :

Phase aqueuse :	H <sub>2</sub> O	43,40 g	
	HEC	2,61 g	(6 %/eau)
	NH <sub>3</sub>	5,0 g	(1 mol/l)

E. Coli      4 g      (soit 1 g de cellules sèches)  
Phase organique : Arlacel 83® 17,35 g      (2,04 %/Isopar)  
Isopar M® 850 g  
TEOS      39 g

5

Préparation de la phase aqueuse :

On homogénéise le HEC dans l'eau épurée au bain marie à 40°C pendant 20 minutes environ. On obtient ainsi un mélange visqueux jaune  
10 limpide. On y ajoute alors les cellules puis la solution aqueuse ammoniacale.

Préparation de la phase organique :

On solubilise l'Arcacel 83® dans l'Isopar M®.

15

Préparation de l'émulsion :

La phase organique et la phase aqueuse sont émulsifiées à l'aide d'un ultraturrax, on obtient ainsi une dispersion eau/huile présentant une  
20 stabilité de plusieurs heures. La taille des gouttelettes est voisine de la dizaine de microns.

Synthèse des capsules :

25 Dans un tricol de 2 litres d'un barreau aimanté, on introduit l'émulsion préparée précédemment.

On y ajoute le silicate d'éthyle (39 g) avec un débit de 0,8 ml/min (durée de l'introduction de TEOS = 1 heure) à 25°C.

Les capsules obtenues sont séparées et lavées 1 fois à l'éthanol  
30 puis 2 fois au tampon phosphate puis séchées à température ambiante pendant une nuit.

Caractérisations :

La taille des capsules est comprise entre 1 et une dizaine de  $\mu\text{m}$  (MEB).

- 5 La taille des particules de silice constitutrices de l'écorce est de quelques nanomètres. Les observations faites par MET mettent clairement en évidence l'encapsulation des bactéries par la capsule de silice.

10 Exemple 4 : Obtention de capsules avec TMOS et co-alcoxyde ( $[\text{NH}_3] = 0,1 \text{ mol/l}$ ).

Composition globale du milieu réactionnel :

15	Phase aqueuse :	H <sub>2</sub> O	43,40 g	
		HEC	2,61 g	(6 %/eau)
		NH <sub>3</sub>	0,37 g	soit $[\text{NH}_3] = 0,1 \text{ mol/l}$
		E. Coli	4 g	(soit 1 g de cellules sèches)
	Phase organique :	Arlacel 83 <sup>®</sup>	17,35 g	(2,04 %/Isopar)
20		Isopar M <sup>®</sup>	850 g	
	Phase organique 2 :	TMOS	22,8 g	
		O-TMOS	5,7 g	

Préparation de la phase aqueuse :

25

On homogénéise le HEC dans l'eau épurée au bain marie à 40°C pendant 20 minutes environ. On obtient ainsi un mélange visqueux jaune limpide. On y ajoute alors les cellules puis la solution aqueuse ammoniacale (0,37 g).

30

Préparation de la phase organique 1 :

On solubilise l'Arlacel 83<sup>®</sup> dans l'Isopar M<sup>®</sup>.

### Préparation de l'émulsion :

La phase organique 1 et la phase aqueuse sont émulsifiées à l'aide d'un ultraturrax, on obtient ainsi une dispersion eau/huile présentant une stabilité de plusieurs heures. La taille des gouttelettes est voisine de la dizaine de microns.

### Mode opératoire :

10

Dans un tricol de 2 litres muni d'un barreau aimanté, on introduit l'émulsion préparée précédemment.

On y ajoute le mélange d'alcoxydes (phase organique 2) avec un débit de 0,5 ml/min (la durée de l'introduction est de 1 heure) à 25°C.

15

Les particules obtenues sont séparées et lavées au méthanol puis séchées à température ambiante pendant une nuit. Les particules ainsi obtenues sont hydrophobes.

### Caractérisations :

20

La taille des particules est comprise entre 1 et une dizaine de  $\mu\text{m}$  (MEB).

La taille des particules de silice constitutrices de l'écorce est de quelques nanomètres (MET).

25

## REVENDICATIONS

1. Capsule minérale constituée d'une écorce minérale et d'un noyau liquide dans lequel est immobilisée au moins une matière active biologique.
- 5 2. Capsule selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'écorce minérale est constituée d'au moins un oxyde et/ou hydroxyde d'aluminium, de silicium, de zirconium et/ou d'un métal de transition.
3. Capsule selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'écorce minérale est constituée d'au moins un oxyde et/ou hydroxyde de  
10 silicium, aluminium, titane et de zirconium.
4. Capsule selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'écorce minérale comprend au moins un oxyde de silicium.
5. Capsule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le milieu liquide constituant le noyau de ladite capsule  
15 correspond au milieu biologique naturel de la matière active biologique immobilisée.
6. Capsule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le milieu liquide constituant le noyau de ladite capsule est propice à la conservation de la structure et l'activité de la matière active  
20 biologique immobilisée.
7. Capsule selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le milieu liquide constituant le noyau de ladite capsule est propice au développement interne de la matière active biologique immobilisée.
8. Capsule selon l'une des revendications précédentes,  
25 caractérisée en ce que la matière active biologique est choisie parmi les organismes cellulaires comme les microorganismes de type bactéries, levures, champignons, algues, cellules d'origine animale ou végétale, les enzymes ou protéines.
9. Capsule selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'il  
30 s'agit de cellules ou organismes vivants.
10. Capsule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle possède une taille comprise entre 1 et plusieurs dizaine de micromètres.

11. Capsule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que son écorce minérale possède une épaisseur variant entre 1 et 200 nm.

12. Procédé pour la préparation de capsules selon l'une des revendications 1 à 11, ledit procédé comprenant

1) la mise en émulsion d'un milieu liquide contenant au moins une matière active biologique au sein d'une seconde phase non miscible avec ledit milieu liquide de manière à l'y disperser sous forme de gouttelettes,

2) la mise au contact, au sein de l'émulsion ainsi obtenue, d'au moins un composé hydrolysable et polycondensable de zirconium, silicium, aluminium et/ou un métal de transition dans des conditions de température et de pH propices à la formation d'un précipité constitué de l'oxyde ou l'hydroxyde correspondant et

3) la récupération des capsules minérales ainsi formées et le cas échéant leur purification, ledit procédé étant caractérisé en ce que la formation du précipité minéral dans la seconde étape est conduite en présence d'un système tensioactif amphiphile, présent au niveau de l'émulsion et capable de concentrer le dépôt des particules minérales dudit précipité formé à l'interface des gouttelettes et de la seconde phase et de bloquer efficacement leur diffusion au sein desdites gouttelettes.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le système tensioactif amphiphile résulte de l'interaction in situ entre un premier composé présent dans la seconde phase et un composé présent dans le milieu liquide.

14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que le système tensioactif comprend au moins un tensioactif doté d'une valeur HLB inférieure à 7.

15. Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que le tensioactif présent dans la seconde phase est un ester de sorbitan.

16. Procédé selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que le composé présent dans le milieu liquide est un dérivé de cellulose.



17. Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que l'émulsion est obtenue mécaniquement et/ou par sonication.

18. Procédé selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce que le composé hydrolysable et polycondensable répond à la formule  
5 générale II :



dans laquelle :

- M représente un élément choisi parmi le titane, manganèse, fer, cobalt, nickel, silicium, aluminium ou zirconium,
- 10 – R est un substituant hydrolysable,
- n est un entier compris entre 1 et 6,
- P est un substituant non hydrolysable et
- m est un entier compris entre 0 et 6.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il  
15 s'agit de préférence d'un alcoxyde de silicium.

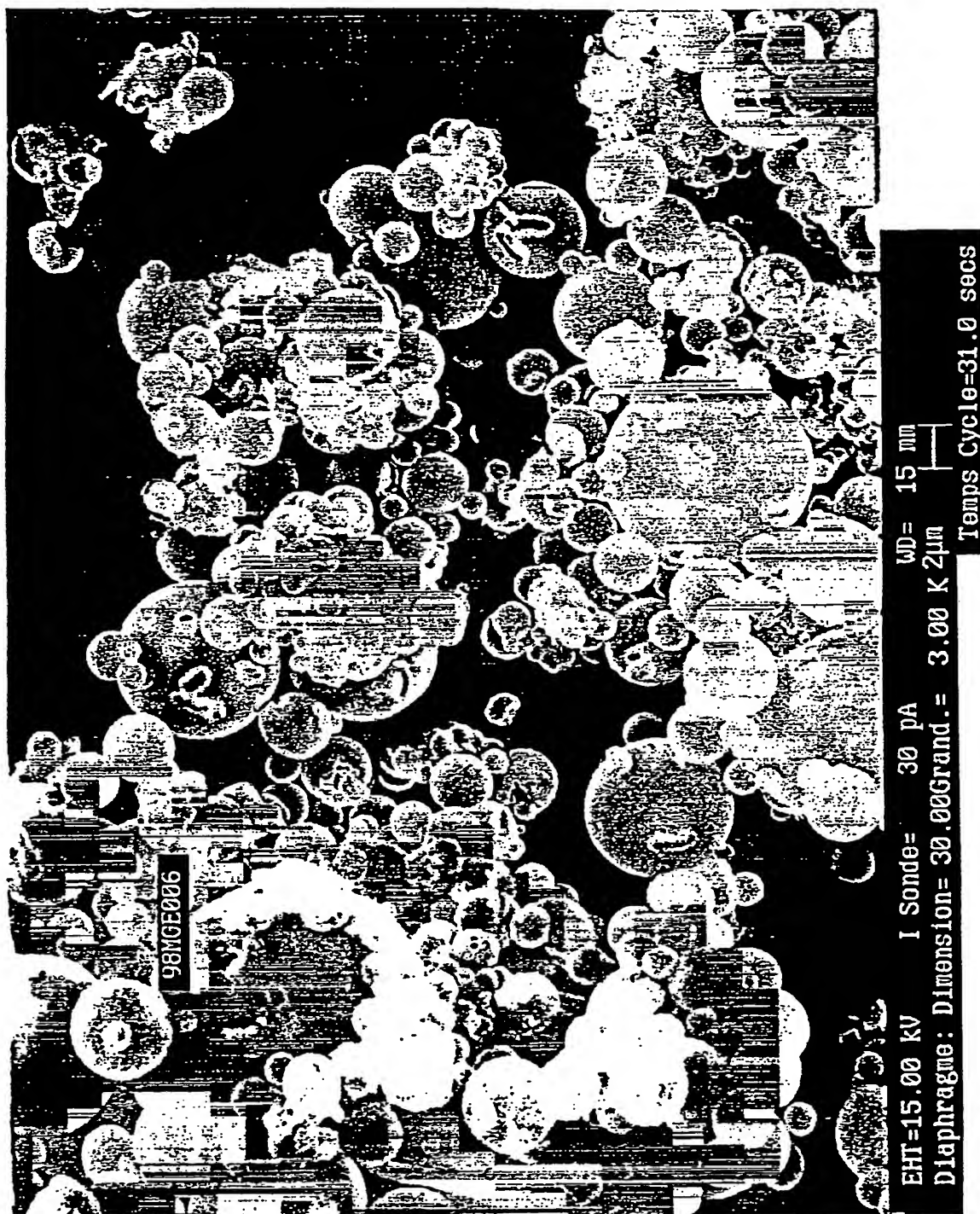
20. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que l'alcoxyde de silicium est choisi parmi les tétraméthylorthosilicate, tétraéthylorthosilicate et tétrapropylorthosilicate.

21. Procédé selon l'une des revendications 12 à 20, caractérisé  
20 en ce que la formation du précipité est conduite en présence d'un agent d'hydrolyse et de condensation dudit composé.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'agent d'hydrolyse et de polycondensation est l'ammoniaque.

23. Utilisation des capsules selon l'une des revendications 1 à  
25 11 dans les domaines de fermentation, biomédicaux, alimentaires et en industrie chimique.

1/2

FIG.1

212

FIG. 2

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 564026  
FR 9813695

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 5 693 513 A (E.J.A. POPE) 2 décembre 1997 (1997-12-02) * revendications * * colonne 6, ligne 1 - ligne 2 * * colonne 6, ligne 15 - ligne 23 *	1-11
A	DATABASE WPI Week 9520 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-151536 '18! XP002108961 * abrégé * & JP 07 075728 A (SUZUKI YUSHI KOGYO KK, JP) 20 mars 1995 (1995-03-20)	1-23
A	WO 91 07349 A (ALLIED SIGNAL) 30 mai 1991 (1991-05-30) * le document en entier *	1-23
A	WO 97 41842 A (UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 13 novembre 1997 (1997-11-13) * revendications * * page 10, ligne 8 - ligne 26 *	1-23
E	WO 99 09142 A (SOLGENE) 25 février 1999 (1999-02-25) * revendications * * page 5, ligne 25 - page 6, ligne 1 * * page 5, ligne 8 - ligne 9 *	1-11
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 juillet 1999		Scarponi, U
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

2

EPO FORM 1503 03.92 (P4/C13)